

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670640

研究課題名(和文)脳腫瘍幹細胞の表面マーカーの長期追跡と安定性を保持する機構の解明

研究課題名(英文)Surface marker expressions on glioma stem cells.

## 研究代表者

大江 直行(OHE, Naoyuki)

岐阜大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60362159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍の中には腫瘍の発生、再発、治療抵抗性の元凶となる癌幹細胞が含まれている。このため癌幹細胞を標的とした治療法の開発が次世代の癌治療として期待されている。癌幹細胞は幹細胞特異的な表面マーカーを発現しておりセルアナライザーを用いるなどして単離が可能である。我々は悪性脳腫瘍幹細胞に発現しているCD133やCD44など20種類程度の表面マーカーを長期間にわたって解析した。

研究成果の概要(英文)：Malignant brain tumors stem cells are the primary cause of tumor development, recurrence, and resistance to treatment. Cancer stem cells express stem cell-specific surface markers and can be isolated by using a cell analyzer. We analyzed about 20 kinds of surface markers such as CD133 and CD44 expressed in malignant brain tumor stem cells over a long period of time.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：脳腫瘍 脳腫瘍幹細胞 CD133 CD44 CD15 NCAM CD56 CXCR4

1. 研究開始当初の背景

約 10 年前に提唱された脳腫瘍幹細胞において、当初は CD133 が特異的マーカーとされたが、その後、CD133 陰性細胞にもがん幹細胞の特性を持った細胞群があると報告され、後に CD15, Integrin alpha6 等が特異的マーカーとして追加されている。さらに、近年 FACS を用いて従来の表面マーカーを指標とせず、FL1 にて自己発光する細胞群もがん幹細胞だと報告された。しかし、多くの報告があるにもかかわらず、研究に使用する免疫不全マウスの違いなどもあり、未だ脳腫瘍幹細胞の特異的マーカーは無いと言ってよい状況である。さらに、複雑な性格を持つ脳腫瘍幹細胞が、ただ一つのマーカーだけで選択出来るかも議論の余地がある。このため、各種の幹細胞マーカーが培養過程においてどのように変遷し、いずれのマーカーが安定して表出し、その安定性が意味するところを知る事はあらたなマーカーを選別する上でも必須である。

2. 研究の目的

従来 CD133 が脳腫瘍幹細胞のマーカーとして広く知られていたが、CD133 陰性細胞にも脳腫瘍幹細胞の特性があるとされ、CD15, Integrin alpha 6 などが他のマーカーとして挙げられているが未だ決定的なマーカーは無い。我々は、樹立した脳腫瘍幹細胞株の各種表面マーカーの変遷を、摘出術直後から 2 年以上の長期に渡り観察してきた。このなかで長期にわたり安定して出現しているものもあれば増減しているものもみられた。本研究の目的は、安定している表面マーカー及び変化しているマーカーの役割とその機構を調べることである。

3. 研究の方法

以下の手順で研究を立案した。

- 1) いくつかの細胞株で時間軸に沿って免疫不全マウスへの移植実験を行い、腫瘍形成に差異があるか確認する
- 2) 安定して発現している表面マーカーは shRNA などの手法で knockdown 試験を行う
- 3) 不安定に発現している表面マーカーは強制発現によりその機能を確認する
- 4) リガンドの明らかな表面マーカーに対してリガンドとそのレセプター機能及び下流の転写因子などを検索する
- 5) 結果を統合し新たな脳腫瘍幹細胞マーカーの可能性を探る

4. 研究成果

我々は本研究立案にいたった成果を

Surface Protein Dynamics in Glioma Stem Cells. Authors: Soeda A, Ohe N, Lee D,

**Table 3. Marker Expressions in Middle-term Cultured Glioma CSCs**

Marker expression (%)	X04		X06		X07	
	3months	6months	3months	6months	3months	6months
<b>Glioma CSC Marker</b>						
CD133	2.4	2.8	1.1	1.8	1.8	2.8
CD15 (SSEA1)	0.2	0.2	1.2	1.1	0.7	1.1
Sox2 (ICS)	95.6	97.6	96.0	91.3	97.5	98.0
Bmi1 (ICS)	55.7	81.8	54.2	86.0	36.1	44.5
<b>Glioblastoma Marker</b>						
CD44 (HCAM)	97.3	86.8	98.8	88.9	92.7	86.4
A2B5	4.9	7.7	6.4	12.2	1.9	1.8
PDGFRα (CD140a)	0.4	0.6	1.1	0.6	0.9	0.9
<b>Neuronal Marker</b>						
CD24	93.5	93.5	97.0	97.4	91.0	85.3
NCAM (CD56)	48.6	44.0	61.9	64.7	34.8	50.0
<b>Others</b>						
CXCR4 (CD186)	12.7	6.3	11.6	13.7	10.2	10.6
ICAM-1 (CD54)	40.0	32.2	53.7	46.1	24.3	23.5
MCAM (CD146)	97.5	88.7	93.9	84.9	79.4	56.6
ALCAM (CD166)	54.2	75.4	40.2	52.7	61.3	38.6
EGFR	30.9	43.2	66.4	59.7	55.6	67.8

Numbers indicated % expressions of surface markers. Flow cytometry data were collected at 3 months and 6 months after amplifying cells. Abbreviations, ICS: Intracellular Staining.

Iwama T and Park DM に発表した。これによ

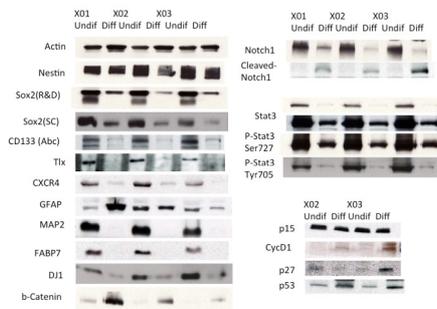
**Table 4. Marker Expressions in Long-term Cultured Glioma CSCs**

Marker expression (%)	X01			X02			X03		
	3-6months	6-12months	12-36months	3-6months	6-12months	12-36months	3-6months	6-12months	12-36months
<b>Glioma CSC Marker</b>									
CD133	5.0	4.1	6.4	2.3	6.7	2.6	7.4	5.3	2.9
CD15 (SSEA1)	0.2	1.1	ND	1.4	0.8	ND	0.3	0.3	ND
Sox2 (ICS)	85.3	ND	91.2	94.0	ND	96.3	86.0	ND	91.2
Bmi1 (ICS)	78.4	ND	78.6	69.1	ND	72.3	59.2	ND	65.4
<b>Glioblastoma Marker</b>									
CD44 (HCAM)	90.4	87.4	100.0	11.5	42.1	93.5	96.0	91.9	99.9
A2B5	6.7	3.0	11.8	23.5	11.2	10.8	18.8	5.9	8.5
PDGFRα (CD140a)	0.2	ND	ND	0.2	ND	ND	1.5	ND	ND
<b>Neuronal Marker</b>									
CD24	10.4	7.1	61.9	99.3	73.8	11.0	37.6	43.9	43.9
NCAM (CD56)	92.4	99.8	73.4	92.1	96.0	90.2	65.9	54.2	61.0
<b>Others</b>									
CXCR4 (CD186)	44.0	29.3	41.4	16.7	30.5	20.3	50.4	32.7	41.9
ICAM-1 (CD54)	96.8	95.6	95.0	84.9	89.4	81.1	96.6	94.5	91.2
MCAM (CD146)	90.8	91.3	89.8	83.6	92.1	92.6	89.5	94.2	41.2
ALCAM (CD166)	16.4	14.7	30.4	71.4	88.9	68.4	68.7	77.8	38.6
EGFR	47.1	44.0	42.0	57.0	58.0	42.0	61.0	44.0	46.0

Flow cytometry data were collected between 3-6, 6-12 and 12-36 months after amplifying cells. Between 3 to 6 months, data were collected once. Between 6 to 12 months, data were collected twice each 9 months and averaged. Between 12 to 36 months, data were collected twice each 12-18 months and averaged. Numbers indicated mean % expressions of surface markers. Abbreviations, ICS: Intracellular Staining, ND: Not done.

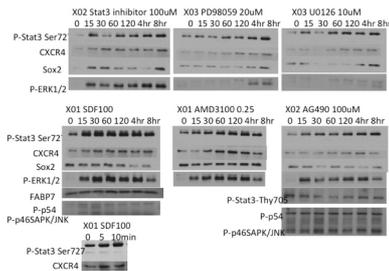
り我々の樹立した脳腫瘍幹細胞株は長期間にわたって安定して幹細胞特異的細胞表面マーカーを発現していることが明らかとなった。中期各種表面マーカー発現パターン (既報) 長期各種表面マーカー発現パターン (既報)

研究立案に沿ってまず CXCR4 をモデルに研究を開始した。Flow cytometry により CXCR4



が血清添加により減少し、低酸素により増加することを立案段階で明らかとしていたが、本研究期間中にその他の幹細胞特異的タンパクをふくめウェスタンブロッティングにより確認した (下)。

研究計画どおり当該年度に CXCR4 を阻害剤である AMD3100 で knockdown し、そのリガンドである SDF1 添加により、すでに報告されている Jak-Stat3, MAPK pathway などの動態も検証した。



表面マーカーを含めた脳腫瘍幹細胞の多様性に関して以下の論文発表を行った。The evidence of glioblastoma heterogeneity. Sci Rep. 2015 Jan 27;5:7979.

また、研究の経過の中で p38MAPK と EGFR が脳腫瘍幹細胞の増殖に関わっていることを明らかとしたので論文発表をおこなった。The p38 signaling pathway mediates quiescence of glioma stem cells by regulating epidermal growth factor receptor trafficking. Oncotarget. 2017 Mar 31.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 大江直行: ベバシズマブ治療の実際と最新情報. 脳神経外科速報 25: 74-80, 2015 査読有り

[学会発表] (計14件)

- ① 大江直行, 辻本真範, 西脇崇裕貴, 中山則之, 矢野大仁, 岩間 亨: 視交叉原発 pilocytic astrocytoma の2例. 第34回日本脳腫瘍学会学術集会. 甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市), 2016. 12. 4
- ② 大江直行, 辻本真範, 西脇崇裕貴, 大村一史, 熊谷信利, 江頭裕介, 榎本由貴子, 中山則之, 矢野大仁, 岩間 亨: 脳出血に対する内視鏡手術および開頭手術後経過の比較検討. 日本脳神経外科学会第75回学術総会. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2016. 9. 29
- ③ Ohe N, Tsujimoto M, Nakayama N, Yano H, Iwama T: Two cases of pilomyxoid astrocytoma. 17th International Symposium on Pediatric Neuro-oncology. Liverpool Convention Centre(UK Merseyside・Liverpool), 2016. 6. 14
- ④ 大江直行, 矢野大仁, 中山則之, 岩間 亨: 当院における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療成績. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会. グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市), 2015. 12. 6
- ⑤ 副田明男, 江頭裕介, 榎本由貴子, 中山則之, 大江直行, 矢野大仁, 小倉真治,

岩間 亨: くも膜下出血後脳血管攣縮を予測する経時的スコア (Vasospasm Score) の有用性. 日本脳神経外科学会第74回学術総会. ロイトン札幌(北海道・札幌市), 2015. 10. 14

- ⑥ 大江直行, 水谷大佑, 岡 直樹, 加藤貴之, 石黒光紀, 田中嘉隆, 岡田 誠, 中山則之, 矢野大仁, 新川修司, 横山和俊, 篠田 淳, 林 克彦, 白紙伸一, 岩間 亨: 神経内視鏡下脳生検術18例の検討. 日本脳神経外科学会第74回学術総会. ロイトン札幌(北海道・札幌市), 2015. 10. 15
- ⑦ 大江直行, 中山則之, 矢野大仁, 岩間 亨: 内視鏡assistによる座位での infratentorial supracerebellar approachによる松果体近傍病変摘出術. 第20回日本脳腫瘍の外科学会. 名古屋観光ホテル(愛知県・名古屋市), 2015. 9. 25
- ⑧ 大江直行, 川崎智弘, 中山則之, 矢野大仁, 岩間 亨: ジャーミノーマの長期治療成績. 第43回日本小児神経外科学会. 海峡メッセ(山口県・下関市), 2015. 6. 13
- ⑨ 大江直行, 矢野大仁, 齊郷智恵美, 宮崎龍彦, 中山則之, 岩間 亨: 頭蓋内 meningeal myxoma の1例. 第33回日本脳腫瘍病理学会学術集会. JR ホテルクレメント高松(香川県・高松市), 2015. 5. 29
- ⑩ Ohe N, Nakayama N, Yano H, Iwama T: Long-term outcomes and late complication for central nervous system germinomas. The 4th International CNS Germ Cell Tuumor Symposium. Happon-en(JapanTokyo・Minato-ku), 2015. 4. 15
- ⑪ Ohe N, Kawasaki T, Nakayama N, Yano H, Iwama T: 2 cases of Blake's pouch cyst wadergone endoscopic third wadergone ventriculostomy. The Asian-Australasian Society for Pediatric Neurosurgery. Evergreen International Convention Center(Taiwan・Taipei), 2015. 3. 21
- ⑫ 大江直行, 矢野大仁, 山内圭太, 川崎智弘, 中山則之, 岩間 亨: 当科における小児 ependymoma の治療成績. 日本脳神経外科学会第73回学術総会. グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区), 2014. 10. 11
- ⑬ Ohe N, Yano H, Nakayama N, Iwama T: Management and outcome of pediatric ependymomas: a single institution experience. 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology. Suntec Singapore International Convention and Exhibition Centre(Singapore・Marina), 2014. 6. 30
- ⑭ 大江直行, 川崎智弘, 小林一博, 齊郷智恵美, 中山則之, 矢野大仁, 宮崎龍彦, 岩間 亨: 再発後急増大し glioblastoma 様の組織像を呈した medulloblastoma の

1 例. 第 32 回日本脳腫瘍病理学会学術集会. あわぎんホール(徳島県・徳島市), 2014. 5. 24

( )

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
岐阜大学医学部脳神経外科  
<http://www.med.gifu-u.ac.jp/neurosurgery/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大江 直行 (OHE, Naoyuki)  
岐阜大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 60362159

### (2) 研究分担者

矢野 大仁 (YANO, Hirohito)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00332685

副田 明男 (SOEDA, Akio)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20444276

澤田 重信 (SAWADA, Shigenobu)  
岐阜大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 40610415

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者